

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 6 月 6 日 (06.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/44362 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09,
15/12, C07K 14/705, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q
1/02, A61K 38/00, A61P 3/10, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10472

(22) 国際出願日: 2001 年 11 月 30 日 (30.11.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-367349 2000 年 12 月 1 日 (01.12.2000) JP
特願2001-243841 2001 年 8 月 10 日 (10.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内
製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本
町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大石 崇秀
(OHISHI, Takahide) [JP/JP]. 高崎 淳 (TAKASAKI,
Jun) [JP/JP]. 松本 光之 (MATSUMOTO, Mitsuyuki)

[JP/JP]. 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]. 蒲原正純
(KAMOHARA, Masazumi) [JP/JP]. 曾我 幸利 (SOGA,
Takatoshi) [JP/JP]. 吉田 茂 (YOSHIDA, Shigeru)
[JP/JP]. 上田 能孝 (UEDA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒
305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 森田 憲一, 外 (MORITA, Kenichi et al.); 〒
173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央
ビル5階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING REMEDY FOR DIABETES

(54) 発明の名称: 糖尿病治療剤スクリーニング方法

(57) Abstract: Convenient screening tools and a screening method for obtaining a remedy for diabetes, medicinal compositions for treating diabetes and a process for producing these compositions are disclosed. The above-described screening tools involve a G protein-coupled receptor promoting insulin secretion under a high glucose concentration, a functionally equivalent modification thereof, a polypeptide homologous therewith, and cells having been transformed by an expression vector containing a polynucleotide encoding the above-described polypeptide and expressing the above-described polypeptide.

(57) 要約:

糖尿病治療剤を得るための簡便なスクリーニングツール及びスクリーニング方法、並びに糖尿病治療用医薬組成物及びその製造方法を開示する。

前記スクリーニングツールは、活性化されることによって、高グルコース濃度下において、インスリン分泌を促進するGタンパク質共役型受容体、その機能的等価改変体、又は相同ポリペプチドであるか、あるいは、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している細胞である。

WO 02/44362 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

糖尿病治療剤スクリーニング方法

技術分野

本発明は、糖尿病治療剤スクリーニング方法に関する。

背景技術

糖尿病は、持続的高血糖状態を伴う疾患であり、多くの環境因子と遺伝的因子とが作用した結果、生じると言われている。血糖の主要な調整因子はインスリンであり、高血糖は、インスリン欠乏、あるいは、その作用を阻害する諸因子（例えば、遺伝的素因、運動不足、肥満、又はストレス等）が過剰となって生じることが知られている。

糖尿病には主として2つの種類があり、自己免疫疾患などによる膵インスリン分泌機能の低下によって生じるインスリン依存性糖尿病（I D D M）と、持続的な高インスリン分泌に伴う膵疲弊による膵インスリン分泌機能の低下が原因であるインスリン非依存性糖尿病（N I D D M）とに分けられる。日本人の糖尿病患者の95%以上は、N I D D Mと言われており、生活様式の変化に伴い、患者数の増加が問題となっている。

糖尿病の治療は、軽症においては、食事療法、運動療法、及び肥満の改善等が主として行われ、更に進行すると、経口糖尿病薬（例えば、スルホニルウレア剤等のインスリン分泌促進剤）の投与が行われ、更に重症の場合は、インスリン製剤の投与が行われている〔阿部隆三及び春日雅人編集、「Evidence-Based Medicineをめざす糖尿病治療」、南江堂、1997年；Richard A. Harriganら、Annals of Emergency Medicine, 38（1），68-78，2001；並びに日本糖尿病学会編、「糖尿病治療ガイド2000」、文光堂、2000年〕。

スルホニルウレア剤は、膵 β 細胞を刺激し、内因性インスリン分泌を促進するが、インスリン分泌のタイミング及び分泌量は、血糖値とは関係なく、薬物の投

与タイミング及び投与量によって決まる。このため、副作用として薬剤の作用持続に起因する低血糖を呈する場合がある。また、食欲不振等の消化器症状が現れる。更に、重症ケトosis又は肝若しくは腎機能障害のある患者には禁忌である [Richard A. Harriganら, *Annals of Emergency Medicine*, 38 (1), 68-78, 2001]。

インスリン製剤は、確実に血糖を低下させるが、注射により投与しなければならない上に、低血糖になるおそれもある [McCrimmon RJら, *Diabetes Metab.*, 20 (6), 503-512, 1994]。

このように従来用いられているインスリン分泌促進剤及びインスリン製剤は、前記課題を有していた。そこで、より高度な血糖管理が可能な薬剤、すなわち、単に血糖を下げる薬剤ではなく、正常範囲内に血糖をコントロールすることのできる薬剤が切望されていた。

一方、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)、PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)、及びGIP (Gastric inhibitory polypeptide) は、それぞれ、特異的なGタンパク質共役型受容体を介して、細胞内にシグナルを伝達し、インスリン分泌を促進することが知られている。これらのGタンパク質共役型受容体は、いずれもGsタンパク質と共役しており、アデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP濃度を上昇させるタイプの受容体である。また、GLP-1受容体、PACAP受容体、及びGIP受容体は、いずれも細胞内cAMP濃度を上昇させることにより、インスリン分泌を促進することが知られている。しかし、これらのGタンパク質共役型受容体の発現分布は、膵臓に分布しているが、膵特異的ではなく [Dunphy JLら, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 141 (1-2), 179-186, 1998; Timothy James Kiefferら, *Endocrine Reviews*, 20 (6), 876-913, 1999; David Vaudryら, *Pharmacological Reviews*, 52 (2), 269-324, 2000; Jean Claude Reubiら, *Cancer Research*, 60, 3105-3

112, 2000; 及び Ted B. Usdinら, *Endocrinology*, 133 (6), 2861-2870, 1993]、また、GIP受容体を活性化させてもNIDDMで効果がないことが知られている (Michael A. Nauckら, *J. Clin. Invest.*, 91, 301-307, 1993)。

なお、本発明で用いることのできる「配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列、及びその塩基配列がコードする推定アミノ酸配列について、種々の報告 (WO00/22131号、WO00/31258号、及びWO00/50562号各パンフレット) がある。しかし、これらの報告では、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」の生体内での機能は明確になっていなかった。例えば、WO00/22131号及びWO00/31258号各パンフレットには、ヒトオーファンGタンパク質共役型受容体と記載され、また、WO00/50562号パンフレットでは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」のアゴニスト及びアンタゴニストの用途として、アゴニスト及びアンタゴニストの両方に同一の多数の疾患を羅列しているものの、アゴニスト及びアンタゴニストの何れについても、それらの疾患の治療に有用であるとの裏付けは記載されていない。

発明の開示

本発明の課題は、脾特異的であって、高グルコース濃度下において、活性化されることにより、インスリン分泌を促進するポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチドを提供し、正常範囲内に血糖をコントロール可能な糖尿病治療剤 (特にインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤) として有用な物質を得るための簡便なスクリーニング系を提供し、更に、前記スクリーニング系により得られる物質を含有する糖尿病治療剤を提供することにある。

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、脾臓特異的に発現している「配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」

を膵β細胞株に過剰発現させ、高グルコース濃度下で活性化することにより、インスリン分泌量が増加すること、一方、低グルコース濃度下で活性化した場合は、インスリン分泌量に変化がないとの知見を得、前記ポリペプチド及び前記ポリペプチドを発現する細胞が、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進効果を有し、正常範囲内に血糖をコントロール可能な糖尿病治療剤のスクリーニングツールとなることを見出した。また、前記スクリーニングツールを用いた新規な糖尿病治療剤のスクリーニング方法を提供することに成功した。そして、糖尿病治療効果を有することが知られていない公知化合物を、前記スクリーニング方法にかけることにより取得した活性化物質が、糖負荷時にラットの血漿中インスリン量増加作用、及び血糖低下作用を示すこと、並びに、糖尿病モデルラットで、糖負荷時に血糖値の上昇が抑制されることを確認し、本発明のスクリーニング方法の有用性をより明確にし、前記ポリペプチド活性化の分析を用いた糖尿病治療用医薬組成物の製造法を確立し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

[1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール；

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール；

[3] 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グル

コース濃度下、活性化されることにより、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は（b）活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール；

〔4〕〔1〕～〔3〕記載のポリペプチドが、（a）高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び（b）活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示す、糖尿病治療剤スクリーニングツール；

〔5〕配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール（以下、〔1〕～〔5〕記載の糖尿病治療剤スクリーニングツールを、総称して、ポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールと称する）；

〔6〕〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している細胞である、糖尿病治療剤スクリーニングツール（以下、形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツールと称する）；

〔7〕〔6〕記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、糖尿病治療剤をスクリーニングする方法；

〔8〕〔6〕記載の細胞、若しくはその細胞膜、又は〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドと、試験化合物とを、〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、及び前記細胞若しくはその細胞膜又は前記ポリペプチドへの標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程を含む、糖尿病治療剤をスクリーニングする方法；

〔9〕糖尿病治療剤がインシュリン分泌促進剤である、〔7〕又は〔8〕記載のスクリーニングする方法；

〔10〕〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの活性化物質を含有する、糖尿病治療用医薬組成物；

〔11〕〔7〕又は〔8〕記載の方法によって得られる物質を含有する、糖尿病治療用医薬組成物；

〔12〕インシュリン分泌促進用医薬組成物である、〔10〕又は〔11〕記載の糖尿病治療用医薬組成物；

〔13〕〔6〕記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、及び分析した物質を製剤化する工程を含む、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法；

〔14〕〔6〕記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを、〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、前記細胞又はその細胞膜への標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程、及び分析した物質を製剤化する工程を含む、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法；

〔15〕糖尿病治療用医薬組成物がインシュリン分泌促進用医薬組成物である、〔13〕又は〔14〕記載の製造方法；

〔16〕〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの活性化物質を、糖尿病治療が必要な対象に、有効量で投与することを含む、糖尿病治療方法；

〔17〕〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの活性化物質を、インシュリン分泌促進が必要な対象に、有効量で投与することを含む、インシュリン分泌促進方法；並びに

〔18〕〔1〕～〔5〕記載のポリペプチドの活性化物質の、糖尿病治療用医薬組成物及び／又はインシュリン分泌促進用医薬組成物を製造するための使用に関する。

本明細書において、「糖尿病治療剤」及び「糖尿病治療用医薬組成物」とは、糖尿病患者を治すために用いる医薬ばかりでなく、糖尿病の進行等の予防のために用いる医薬を含む。

また、本明細書において、「スクリーニングツール」とは、スクリーニングのために用いる物（具体的には、スクリーニングのために用いるポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞をいう。「糖尿病治療剤スクリーニングツール」とは、糖尿病治療剤をスクリーニングするために、本発明の糖尿病治療剤をスクリーニングする方法において、試験化合物を接触させる対象となる細胞又は

ポリペプチドである。[1] ~ [5] 記載のポリペプチド、又は [6] 記載の細胞の、糖尿病治療剤スクリーニングのための使用も、本発明に含まれる。

なお、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに関して、本願優先日後に公開された EP 1 0 9 2 7 2 7 号公報には、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド (P F I - 0 0 7) のアミノ酸配列をコードする DNA 配列、及びそれがコードする推定アミノ酸配列が記載されているものの、前記ポリペプチド P F I - 0 0 7 を取得したとの記載はない。そして、ポリペプチド P F I - 0 0 7 をモジュレートする物質の用途として多数の疾患の治療が挙げられ、ポリペプチド P F I - 0 0 7 をモジュレートする物質 (アンタゴニスト又はアゴニスト) を投与することからなる、糖尿病治療法のクレームが存在する。しかし、ポリペプチド P F I - 0 0 7 のアゴニストが糖尿病治療効果を有する裏付けの記載はなく、アンタゴニストも糖尿病治療効果があると記載されていることから、前記アゴニストに糖尿病治療効果があることを見出したのは本願発明者が初めてであることは明らかである。また、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化すると、インシュリン分泌を促進すること、そして、高グルコース濃度下、膵 β 細胞において活性化されることにより、前記膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性 (以下、高グルコース依存性インスリン分泌促進活性と称することがある) を有することは、何ら記載されていない。

前記の通り、本願記載の糖尿病治療剤 (特にインシュリン分泌促進剤) スクリーニングツール、糖尿病治療剤 (特にインシュリン分泌促進剤) スクリーニング方法、糖尿病治療用 (特にインシュリン分泌促進用) 医薬組成物、及び前記医薬組成物の製造方法は、本願発明者らが初めて行なった発明である。

図面の簡単な説明

図 1 は、2 - (ピリジン - 4 - イル) エチル チオベンゾエート (L T - 1 Z 0 0 5 9 5 1 9) を腹腔内投与した S D ラットにおける、グルコース経口負荷後の血漿中インスリン濃度の経時変化を示すグラフである。

図 2 は、2 - (ピリジン - 4 - イル) エチル チオベンゾエート (L T - 1

Z 0059519) を腹腔内投与したSDラットにおける、グルコース経口負荷後の血糖値の経時変化を示すグラフである。

図3は、2-(ピリジン-4-イル)エチルチオベンゾエート(LT-1 Z 0059519) を経口投与したGKラットにおける、グルコース経口負荷後の血糖値の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 糖尿病治療剤スクリーニングツール

本発明の糖尿病治療剤スクリーニングツールには、ポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールと、形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツールとが含まれる。

1) ポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできるポリペプチドとしては、例えば、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース濃度下、膵β細胞において活性化されることにより、前記膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチド(以下、機能的等価改変体と称する)；及び

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース濃度下、膵β細胞において活性化されることにより、前記膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチド(以下、相同ポリペプチドと称する)

を挙げることができる。以下、本発明のポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできるこれらの各種ポリペプチドを、総称して、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるヒト由来のGタンパク質共役型受容体である。また、スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるラット由来のGタンパク質共役型受容体である。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト由来のポリペプチドと、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるラット由来のポリペプチドとは、アミノ酸配列の比較において80.6%の相同性を示す。なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sg i 32 b i t 版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) のb l 2 s e qプログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「b l a s t p」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるこれらのポリペプチドは、(a) 高グルコース依存性インスリン分泌促進活性、及び(b) 細胞において活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性(以下、細胞内cAMP増加活性と称することがある)を示す。なお、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミ

ノ酸配列からなるこれらのポリペプチドは、低グルコース濃度下では、膵 β 細胞において過剰発現することにより活性化されても、前記膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進しない。

なお、本明細書において、「高グルコース濃度下」とは、例えば、血中、あるいは、細胞を取り巻く環境におけるグルコース濃度が、正常な状態におけるグルコース濃度範囲を越えた状態を意味し、特には16.8 mmol/Lである。

また、「低グルコース濃度下」とは、例えば、前記グルコース濃度が、正常な状態におけるグルコース濃度範囲より低い状態を意味し、特には3.3 mmol/L以下である。

本明細書において、或るポリペプチドが「膵 β 細胞において活性化されることにより、前記膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法（好ましくは、後述の実施例5に記載の方法）により確認することができる。すなわち、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、前記ポリヌクレオチドを含まないコントロール用発現ベクターとで、それぞれ、膵 β 細胞を形質転換し、所定日数（例えば、2又は3日間）が経過した後、所定濃度のグルコースを含有する緩衝液に置換して更に所定時間（例えば、数時間）インキュベートし、前記緩衝液（すなわち、培養上清）中のインスリン分泌量をそれぞれ測定する。コントロール用発現ベクターで形質転換した細胞（コントロール細胞）における培養上清中のインスリン分泌量に比べて、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した細胞（試験細胞）における培養上清中のインスリン分泌量が上昇していれば、前記ポリペプチドが「膵 β 細胞において活性化されることにより、前記膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性」を示すと判定することができる。コントロール細胞に対し試験細胞で有意にインスリン分泌量が上昇しているかは、スチューデントの t 検定で判定する。試験細胞でインスリン分泌量が上昇しており、コントロール細胞に対する有意差が、 $p < 0.05$ 、好ましくは $p < 0.01$ である時、有意にインスリン分泌量が上昇していると判断する。

また、本明細書において、或るポリペプチドが「細胞において活性化されるこ

とにより、前記細胞内 cAMP 量を増加させる活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法（好ましくは、後述の実施例 4 に記載の方法）により確認することができる。すなわち、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、前記ポリヌクレオチドを含まないコントロール用発現ベクターとで、それぞれ、細胞を形質転換し、所定時間（例えば、20 時間）が経過した後、ホスホジエステラーゼ阻害剤 [例えば、IBM X (3-isobutyl-1-methylxanthine)] を含有する培地に置換して更に所定時間（例えば、40 分間）インキュベートし、それぞれの細胞における cAMP 量を測定する。コントロール用発現ベクターで形質転換した細胞に比べて、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した細胞における cAMP 量が上昇していれば、前記ポリペプチドが「細胞において活性化されることにより、前記細胞内 cAMP 量を増加させる活性」を示すと判定することができる。

本明細書において、G タンパク質共役型受容体であるスクリーニングツール用ポリペプチドが「活性化」された状態とは、リガンドとの結合の有無に関わらず、G タンパク質共役型受容体の下流にシグナルが伝達されている状態を意味する。活性型 G タンパク質共役型受容体の絶対量が一定量を越えた場合に、これらのポリペプチドは活性化される。

G タンパク質共役型受容体は、不活性型と活性型との間の平衡状態にあり、リガンドが G タンパク質共役型受容体に結合することにより、平衡が活性型にシフトする。G タンパク質共役型受容体を過剰に発現させた場合にも、活性型 G タンパク質共役型受容体の絶対量が増えるため、リガンド非存在下であっても、活性化され、下流にシグナルが伝達されることが知られている (Milano, C. A. ら, Science, 264, 582-586, 1994)。すなわち、G タンパク質共役型受容体は、リガンドが特定されていない場合であっても、G タンパク質共役型受容体を細胞に過剰発現させることにより、その受容体からのシグナルを検出することが可能な場合がある。後述の実施例 4 及び 5 に記載の各実験では、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するリガンド非存在下であっても、これらのポリペプチドを過剰発現させることにより、アゴニストの結合に

よる活性化と同じ状態に活性化されている。

本発明のポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個）、例えば、1～数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、（a）高グルコース依存性インスリン分泌促進活性、及び／又は（b）細胞内cAMP増加活性を示す〔好ましくは、（a）高グルコース依存性インスリン分泌促進活性、及び（b）細胞内cAMP増加活性を両方とも示し、より好ましくは、これらの活性に加えて、（c）低グルコース濃度下では、膵β細胞において過剰発現することにより活性化されても、前記膵β細胞からのインスリン分泌を促進しない〕ことができるポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒト又はラットに限定されない。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのラットにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト及びラット以外の生物（例えば、マウス、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト又はラット由来の変異体、あるいは、ヒト及びラット以外の生物由来の機能的等価改変体）、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸配列を、遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのラットにおける変異体、あるいは、ヒト及びラット以外の生物由来の機能的等価改変体は、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列（例えば、配列表の配列番号1で表される塩

基配列)の情報を基にして、あるいは、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列(例えば、配列表の配列番号15で表される塩基配列)の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法(例えば、Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982)に従って実施することが可能である。

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物[例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)]由来の試料(例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー)とを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法(Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487-491, 1988)又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例5に記載の方法により、高グルコース依存性インスリン分泌促進活性を示すことを確認するか、あるいは、実施例4に記載の方法により、細胞内cAMP増加活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法(site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例5に記載の方法により、高グルコース依存性インスリン分泌促進活性を示すことを確認するか、あるいは、実施例4に記載の方法により、細胞内cAMP増加活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

また、機能的等価改変体には、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドが含まれ、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド（すなわち、融合ポリペプチド）も、(a) 高グルコース依存性インスリン分泌促進活性、及び／又は(b) 細胞内cAMP増加活性を示す限り、含まれる。

前記マーカー配列としては、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明のポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできる相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース依存性インスリン分泌促進活性、及び／又は(b) 細胞内cAMP増加活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することができる。

本発明のポリペプチド型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。より具体的には、後述するスクリーニングツール用形質転換細胞（すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞）を、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養し、受容体タンパク質の分離及び精製に一般的に用

いられる方法により、その培養物から目的タンパク質を分離及び精製することにより調製することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、機能的改変体をコードするポリヌクレオチド、及び相同ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCRを用いた方法、

(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

PCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、スクリーニングツール用ポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行なうことにより、スクリーニングツール用ポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

より詳細には、まず、スクリーニングツール用ポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織（例えば、脾臓）から、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジ

ン・チオシアネートーグアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。スクリーニングツール用ポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロッティング法、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び／又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNAを増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。また、ゲノムDNAから目的とするDNA断片を得ることもできる。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、以下の手順により、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としては、例えば、S1ヌクレアーゼ法(Efstathiadis, A. ら, Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. ら, Nucleic Acids Res., 9, 2251

—2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1049—1053, 1983)、又はOkayama—Berg法(Okayama, H. 及びBerg, P., *Mol. Cell. Biol.*, 2, 161—170, 1982)などを挙げることができる。

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 α 株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン又はアンピシリンに対する薬剤耐性を指標として、組換え体を選択する。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には、Hanahanの方法(Hanahan, D. J., *Mol. Biol.*, 166, 557—580, 1983)、すなわち、CaCl₂、MgCl₂、又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に、前記組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしては、プラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターを用いることもできる。

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(1)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法、(2)PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング法、(3)他の動物細胞で目的ポリペプチドを産生させてスクリーニングする方法、(4)スクリーニングツール用ポリペプチドに対する抗体を用いて選択する方法、又は(5)セレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる方法を採用することができる。

合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ(³²P又は³³Pで標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せ

た複数個のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてPCRを行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、スクリーニングツール用ポリペプチドを産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、又はゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、例えば、 ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

他の動物細胞で目的ポリペプチドを産生させてスクリーニングする方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株を培養し、ポリヌクレオチドを増幅させ、そのポリヌクレオチドを動物細胞にトランスフェクトし、ポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドを細胞表面に産生させる。なお、この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミド、あるいは、動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれを用いることもできる。スクリーニングツール用ポリペプチドに対する抗体を用いて、スクリーニングツール用ポリペプチドを検出することにより、元の形質転換株の中から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

スクリーニングツール用ポリペプチドに対する抗体を用いて選択する方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、予め、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株の細胞表面でポリペプチドを産生させ、スクリーニングツール用ポリペプチドに対する抗体及

び前記抗体に対する2次抗体を用いて、所望のポリペプチド産生株を検出し、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

セレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、スクリーニングツール用ポリペプチドの産生能力を有する細胞から別途調製したmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを適当なポリペプチド翻訳系、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞へ注入したり、あるいは、ウサギ網状赤血球ライゼート又は小麦胚芽等の無細胞系を用いて、ポリペプチドに翻訳させる。スクリーニングツール用ポリペプチドに対する抗体を用いて検出して、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

得られた目的の形質転換株よりスクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを採取する方法は、公知の方法（例えば、Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982）に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機〔例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer（Beckman社製）、又は394 DNA/RNA Synthesizer（Applied Biosystems社製）など〕を用いて合成することができる。

また、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、スクリーニングツール用ポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法（Hunkapiller, M. ら, Nature, 10,

105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる (Crantham, R. ら, *Nucleic Acids Res.*, 9, 143-174, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法 (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5662-5666, 1984)等により実施することができる。

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキシム-ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "*Methods in Enzymology*", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. 及び Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276, 1982)等により行なうことができる。

単離されたスクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、宿主細胞 (好ましくは真核生物、特に好ましくは293-EBNA細胞) を形質転換させることができる。

前記形質転換細胞を培養することにより、前記細胞の細胞表面に生産されるスクリーニングツール用ポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離精製することができる。具体的には、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分を可溶化した後、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー [例えば、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー (H

PLC) 等]、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、スクリーニングツール用ポリペプチドを精製することができる。なお、細胞膜画分を可溶化する際には、できるだけ緩和な可溶化剤（例えば、CHAPS、Triton X-100、又はジキトニン等）を用いることにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、マーカ配列とインフレームで融合して発現させることにより、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、又は精製等が容易になる。前記マーカ配列としては、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げる事ができる。また、マーカ配列とスクリーニングツール用ポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど）が認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とヘキサヒスチジン・タグとをトロンビン認識配列で連結した報告がある（Hayashi, M. K. 及びHaga, T., J. Biochem., 120, 1232-1238, 1996）。

2) 形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツール

本発明の形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできる形質転換細胞（以下、スクリーニングツール用形質転換細胞と称する）としては、例えば、

(i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞；

(ii) 機能的等価改変体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞；及び

(iii) 相同タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞を挙げる事ができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、例えば、先に述べた方法により単離されたスクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくは293-EBNA細胞）を形質転換させることにより取得することができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

本発明者は、スクリーニングツール用ポリペプチドのN末端にシグナルシーケンスを付加することが可能な発現ベクターを用いることにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを細胞膜に過剰発現させることを可能とした。前記発現ベクターは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、前記ポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明者は、293-EBNA細胞を用いることにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを細胞膜に過剰発現させることを可能とした。本発明の形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用形質転換細胞は、前記発現ベクターで形質転換され、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、形質転換細胞型糖尿病治療剤スクリーニングツールとして用いる際に前記ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。スクリーニングツール用形質転換細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzm

an, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Ur laub, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、及び前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞(Invitrogen社)等を挙げることができる。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとするポリヌクレオチドの上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr(Subramani, S.ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS(Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、サイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社)等を挙げるができる。また、発現しようとするポリペプチドの上流に、細胞外への分泌シグナル配列(シグナルシーケンス)、例えば、インフルエンザヘマグルチニンシグナルシーケンスをインフレームで融合することができるようにデザインした発現ベクターを用いることもできる(J. Biol. Chem., 267, 21995-21998, 1992)。このような発現ベクターとして、例えば、前記pEF-BOSに、シグナルシーケンス及びFLAGエピトープをコードする配列を導入したプラスミド(pEF-BOS signal sequence flag plasmid)を用いることができる。

宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社)などを用いることができる。

また、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、S

V40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及び Takebe, Y., *Med. Immunol.*, 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990)、又は pCDM8 (Seed, B., *Nature*, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及び Magnusson, G., *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及び van der Ed, A. J., *Virology*, 52, 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬 (例えば、FuGENE™6 Transfection Reagent; Roche Diagnostics 社製) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, *EMBO J.*, 1, 841-845, 1982) 等により、COS細胞に取り込ませることができる。

更に、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又は pSV2-neo (Southern, P. J. 及び Berg, P., *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞表面にスクリーニングツール用ポリペプチドが生産される。

前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清（FBS）等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

（2）糖尿病治療剤スクリーニング方法

スクリーニングツール用ポリペプチド又はスクリーニングツール用形質転換細胞を用いると、スクリーニングツール用ポリペプチドの活性を制御可能な物質、特に、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングすることができる。先に述べたように、スクリーニングツール用ポリペプチドは、高グルコース濃度下、膵β細胞において活性化されることにより、前記膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性を有する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質は、高グルコース濃度下において、膵β細胞からのインスリン分泌を促進することのできるインスリン分泌促進剤の有効成分として、更には、糖尿病治療剤の有効成分として有用である。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用形質転換細胞それ自体を、糖尿病治療剤（特にインスリン分泌促進剤、より具体的には、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤）のスクリーニングツールとして使用することができる。

本明細書において、「高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進」とは、高グルコース濃度下で、コントロール群に対して有意にインスリン分泌量が増加しており、かつ、コントロール群に対する試験化合物処理群の高グルコース濃度下におけるインスリン分泌増加量が、低グルコース濃度下におけるインスリン分泌増加量の1.5倍以上、好ましくは3倍以上である場合であり、より好ましくは、低グルコース濃度下ではコントロール群に対し試験化合物処理群で有意にインスリン分泌量が増加していない場合をいう。コントロール群に対し試験化合物処理群で有意にインスリン分泌量が増加しているか否かは、例えば、実施例8又

は12に示す条件で実験を行ない、スチューデントのt検定で判定することができる。試験化合物処理群でインスリン分泌量が増加しており、コントロール群に対する有意差が、 $p < 0.05$ 、好ましくは $p < 0.01$ である時、有意にインスリン分泌量が増加していると判断する。

本発明の糖尿病治療剤スクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felicci, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明の糖尿病治療剤スクリーニングツールにより選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

本発明の糖尿病治療剤（特にはインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤）スクリーニング方法は、受容体として機能するようにスクリーニングツール用ポリペプチドを発現させたスクリーニングツール用形質転換細胞又はその細胞膜と試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む限り、特に限定されるものではないが、前記ポリペプチドの活性化を分析するのに用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- 1) 細胞内cAMP濃度の変動を指標とするスクリーニング方法（以下、cAMP型スクリーニング方法と称する）、
- 2) GTP γ S結合法を利用するスクリーニング方法（以下、GTP γ S結合型スクリーニング方法と称する）、及び
- 3) リガンド結合アッセイ法を利用するスクリーニング方法（以下、リガンド結合型スクリーニング方法と称する）

を挙げることができる。

1) cAMP型スクリーニング方法

細胞内cAMP濃度の変動を指標として、糖尿病治療剤（特にはインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤）の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングする場合には、スクリーニングツール用形質転換細胞と、試験化合物とを接触させ、前記細胞内のcAMP濃度の変化を直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）することにより、前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する。すなわち、細胞内cAMP濃度の変動を指標とする本発明のcAMP型スクリーニング方法では、スクリーニングツール用形質転換細胞と試験化合物とを接触させる工程、及び前記細胞内におけるcAMP濃度の変化を分析する工程を含む。より具体的には、後述の実施例6、7、10、又は11に記載の各方法により実施することが好ましい。例えば、試験化合物を一定時間作用させ、細胞内cAMP濃度の上昇を指標に、その EC_{50} が $10\mu M$ 以下（更に好ましくは $1\mu M$ 以下）の試験化合物をアゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

cAMP濃度の変化は、例えば、後述の実施例6又は11に示すように、市販のcAMP測定キット（Amersham社等）を用いて、直接的にcAMP濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、後述の実施例7又は10に示すように、cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の上流にcAMP応答配列（CRE）を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的にcAMP濃度の変化を分析することもできる。

スクリーニングツール用形質転換細胞と試験化合物とを接触させた場合に、前記細胞内のcAMP濃度が上昇すれば、前記試験化合物は、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニストであると判定することができる。なお、コントロールとして、スクリーニングツール用形質転換細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されていない宿主細胞、あるいは、空ベクターで形質転換した形質転換細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物に

よりこれらのコントロール用細胞内のcAMP濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。

市販のcAMP測定キット(Amersham社等)を用いて、直接的にcAMP濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、後述の実施例6に示すように、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した細胞を、遺伝子導入した後、20時間培養し、続いて、培地を吸引した後、1mmol/L-IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)/DMEM400 μ Lを加え、5%CO₂存在下、37℃で10分間インキュベートする。更に、1mmol/L-IBMX/DMEM100 μ Lで希釈した試験化合物(例えば、化合物、ペプチド、又は抗体等)を添加し、更に30分間インキュベートする。培地を吸引し、得られた細胞におけるcAMP量を、市販のcAMP測定キット[例えば、cAMP酵素免疫アッセイ系(cAMP enzyme immunoassay system; Amersham pharmacia biotech社)]を用いて測定する。試験化合物存在下における特異的なcAMP量の上昇が観察された試験化合物を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、糖尿病治療剤としてスクリーニングすることができる。

cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を分析し、間接的にcAMP濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、後述の実施例7に示すように、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子と、cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子[例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流にcAMP応答配列(CRE)を挿入した遺伝子; 例えば、pCRE-Lucベクター(CLONTECH社)]とを導入した細胞を、遺伝子導入した後、18~20時間培養し、培地で希釈した試験化合物を加え、5%CO₂存在下、37℃で5~6時間インキュベートする。培地を吸引し、細胞溶解液で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を測定する。試験化合物存在下における特異的なレポーター活性の上

昇が観察された物質等を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、糖尿病治療剤としてスクリーニングすることができる。

2) GTP γ S結合型スクリーニング方法

GTP γ S結合法 (Lazarenko, S. 及び Birdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993) を利用して、糖尿病治療剤 (特にはインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤) の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質 (すなわち、アゴニスト) をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させた細胞膜を、20mmol/L-HEPES (pH 7.4)、100mmol/L-NaCl、10mmol/L-MgCl₂、及び50mmol/L-GDP混合溶液中で、³⁵Sで標識されたGTP γ S (400pmol/L) と混合する。試験化合物存在下と試験化合物不存在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存するGTP γ Sの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試験化合物存在下における特異的なGTP γ S結合の上昇を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニスト、すなわち、糖尿病治療剤をスクリーニングすることができる。

GTP γ S結合法を利用する本発明のGTP γ S結合型スクリーニング方法では、³⁵Sで標識されたGTP γ S存在下において、スクリーニングツール用形質転換細胞の細胞膜と試験化合物とを接触させる工程、及び前記細胞膜と結合したGTP γ Sと、未結合のGTP γ Sとを分離し、分離されたいずれか一方に含まれる放射活性を分析する工程を含む。

3) リガンド結合型スクリーニング方法

リガンド結合アッセイ法を利用して、糖尿病治療剤 (特にはインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤) の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドに結合する物質をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させたスクリーニングツ

ール用形質転換細胞、若しくはその細胞膜、又はスクリーニングツール用ポリペプチド（好ましくはその精製標品）を調製する。緩衝液、イオン、及び／又はpHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で、前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞若しくはその細胞膜、又は前記ポリペプチドと、例えば、前記cAMP型スクリーニング方法及び／又はGTPγS結合型スクリーニング方法で取得することができる物質〔すなわち、アゴニスト；例えば、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート又はL-α-リゾホスファチジルコリン オレオイル〕の標識体とを、試験化合物と共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し、適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。得られた標識体の結合阻害を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドのリガンドを選択することができる。なお、このリガンドが、アゴニスト又はアンタゴニストであるかについては、前記cAMP型スクリーニング方法及び／又はGTPγS結合型スクリーニング方法などにより確認することができる。

（3）糖尿病治療用医薬組成物

本発明には、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択することのできる、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質〔例えば、DNA、タンパク質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕を有効成分とする医薬組成物が包含される。本発明の医薬組成物は、好ましくは、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を有効成分とする糖尿病の予防及び／又は治療用医薬組成物（糖尿病予防及び／又は治療剤；特にインスリン分泌促進用医薬組成物、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進用医薬組成物）である。

また、糖尿病治療用医薬組成物の品質規格の確認試験において、（1）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及びスクリーニングツール用ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、あるいは、（2）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを、スクリーニングツール用ポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させ

る工程、及び前記細胞又はその細胞膜への標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程からなる分析を行ない、次いで、分析した物質を製剤化することからなる、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

また、前記工程による分析を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明の医薬組成物における有効成分としては、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を用いることができ、前記活性化物質は、例えば、本発明のスクリーニング方法により選択することができる。スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質としては、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択された2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート(後述の実施例7参照)又はL- α -リゾホスファチジルコリン オレオイル(実施例10参照)等を挙げることができ、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエートが好ましい。本発明の医薬組成物は、本発明のスクリーニング方法で得られた物質を有効成分とする医薬組成物に限定されず、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を有効成分とする糖尿病治療用医薬組成物であれば全て包含され、インスリン分泌促進用医薬組成物が好ましく、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進用医薬組成物がより好ましい。

なお、糖尿病治療効果があることの確認は、当業者に公知の方法、あるいは、それを改良した方法を用いることにより実施することができる。例えば、インスリン分泌作用の確認は、例えば、後述の実施例8に記載の方法により行なうことができ、血漿中インスリン量増加作用の確認、あるいは、血糖低下作用の確認は、例えば、後述の実施例9に記載の方法により行なうことができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質[例えば、DNA、タンパク質(抗体又は抗体断片を含む)、ペプチド、又はそれ以外の化合物]を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体、賦形剤、及び/又はその他の添加剤を用いて、医薬組成物として調製することができる。本発明の医薬組成物は、好ましくは、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化し、インスリン分泌を促進させる

物質を有効成分とする糖尿病の予防及び／又は治療用医薬組成物であり、より好ましくは、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化し、高グルコース濃度下特異的にインスリン分泌を促進させる物質を有効成分とする糖尿病の予防及び／又は治療用医薬組成物である。あるいは、本発明は、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を投与する工程を含む、糖尿病の予防及び／又は治療方法である。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、又はポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿

潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、これまで述べたように、本発明のスクリーニングツールの製造に使用することができるが、それ以外にも、例えば、遺伝子治療にも有用である。

例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いる遺伝子治療においては、前記ポリヌクレオチドを脾臓特異的に導入し、スクリーニングツール用ポリペプチドを脾臓特異的に過剰発現させると、リガンドの不在下でも自発的に活性化が生じ、高グルコース濃度下において、インスリンの分泌を促進するため、糖尿病の治療に有用である。遺伝子治療は、例えば、日本遺伝子治療学会編、「遺伝子治療開発研究ハンドブック」、株式会社エヌ・ティー・エス、1999年又はTadashi Ariga及びYukio Sakiyama（有賀 正及び崎山幸雄）、蛋白質 核酸 酵素、40（17）、2772-2780、1995等に記載の方法に従って行なうことができる。

また、スクリーニングツール用ポリペプチド（特には、天然ポリペプチド、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド）の発現を促進する物質（例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの転写活性を促進する物質）は、スクリーニングツール用ポリペプチドを過剰発現させることにより、高グルコース濃度下において、インスリンの分泌を促進することができるため、糖尿病

治療剤（特にインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤）の有効成分として有用である。前記の発現促進物質は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのプロモーター領域を、適当なレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）の上流に連結した発現ベクターを作製し、この発現ベクターで形質転換した細胞と、試験化合物とを接触させ、前記レポーター遺伝子の発現の変化を分析することにより、選択することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法（Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982）に従って実施した。

実施例 1：配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの単離

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする全長 cDNA は、ヒトゲノム DNA（human genomic DNA；TOYOBO 社）を鋳型とし、逆転写酵素—ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により以下の手順で取得した。

フォワードプライマーとして、配列番号 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。なお、前記の各プライマーの 5' 末端には、それぞれ、XbaI 認識配列が付加してある。RT-PCR は、DNA ポリメラーゼ（Pyrobest DNA polymerase；宝酒造社）を用いて、5%ジメチルスルホキシド（DMSO）存在下で、98℃（10 秒間）と 58℃（30 秒間）と 72℃（2 分間）とからなるサイクルを 34 回繰り返すことにより実施した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。

得られた前記断片を制限酵素 *Xba*I で消化した後、*pEF-BOS* プラスミド及び *pEF-BOS* シグナルシーケンスフラッグプラスミド (*pEF-BOS signal sequence flag plasmid*; Mizushima, S. 及び Nagata, S., *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990) に、それぞれクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター (*dideoxy terminator*) 法により DNA シークエンサー (*ABI 377 DNA Sequencer*; Applied Biosystems 社) を用いて決定し、配列番号 1 で表される塩基配列が得られた。

次に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする cDNA の 5' 末端及び 3' 末端を確定するために、ヒト膵由来の cDNA (*Human Pancreas Marathon-Ready cDNA*; Clontech 社) を鋳型として用い、RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) 法を行なった。具体的な操作は、前記 cDNA に添付のマニュアルに従った。

5' - RACE では、1 回目の PCR には、配列番号 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、AP1 プライマー (前記 cDNA に添付) とを使用し、2 回目の PCR には、配列番号 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、AP2 プライマー (前記 cDNA に添付) とを使用した。また、3' - RACE では、1 回目の PCR には、配列番号 7 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、前記 AP1 プライマーとを使用し、2 回目の PCR には、配列番号 8 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、前記 AP2 プライマーとを使用した。

5' - RACE 及び 3' - RACE の 1 回目の PCR は、*Taq* ポリメラーゼ (*LA Taq*; Clontech 社) を用い、98°C (20 秒間) と 64°C (30 秒間) と 72°C (3 分間) とからなるサイクルを 27 回繰り返すことにより実施した。2 回目の PCR は、*Taq* ポリメラーゼ (*LA Taq*; Clontech 社) を用い、98°C (20 秒間) と 64°C (30 秒間) と 72°C (3 分間) とからなるサイクルを 34 回繰り返すことにより実施した。得られた PCR

産物の塩基配列は、それぞれ、ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー (ABI 377 DNA Sequencer; Applied Biosystems 社) を用いて決定した。

5' - RACEにより、5' 末端の配列として、配列番号9で表される塩基配列が得られ、3' - RACEにより、3' 末端の配列として、配列番号10で表される塩基配列が得られた。配列番号9で表される塩基配列では、推定される開始コドン (atg; 第200番~第202番) のすぐ上流に終止コドン (tag; 第161番~第163番) が存在し、前記終止コドンと前記開始コドンとの間には、インフレームで開始コドンとなりうる配列は存在しない。また、配列番号10で表される塩基配列では、予想した位置に終止コドン (taa; 第217番~第219番) が存在した。従って、配列番号1で表される塩基配列が、開始コドン及び終止コドンを含む全長アミノ酸配列をコードする塩基配列であることが判明した。また、この配列から予測されるアミノ酸配列 (335アミノ酸) は、配列番号2で表されるアミノ酸配列であった。予想アミノ酸配列は、Gタンパク質共役型レセプターの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、配列番号1で表される塩基配列がGタンパク質共役型レセプターをコードすることが判明した。

実施例2: 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのmRNAの発現分布の確認

RT-PCR法により、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現分布を、以下の手順で解析した。

まず、ヒトの各臓器 [脳 (扁桃核、尾状核、海馬、脳梁、黒質、及び小脳)、脊髄、下垂体、心臓、胎盤、肺、気管、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、胃、脾臓、骨髓、胸腺、甲状腺、唾液腺、副腎、乳腺、前立腺、精巣、及び卵巣] 由来のポリA⁺ RNA (5 μ g; Clontech 社) をDNアーゼ (DNase; Nippon Gene 社) を用いて37°Cで15分間反応させた。DNアーゼ処理したポリA⁺ RNAの内、4 μ gを用いて、逆転写酵素 (MMLV Reverse Transcriptase; Clontech 社) により42°Cで60分間、及び94°Cで5分間、順次反応させ、cDNAを合成した。合成された

cDNAを滅菌水800 μ lに溶解した。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのmRNAの発現分布は、こうして得られたヒトの各臓器のcDNAを鋳型とし、配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとして用いるPCRにより、解析した。前記PCRは、Taqポリメラーゼ（Ex Taq；宝酒造社）を用い、5%DMSO存在下で、94 $^{\circ}$ C（30秒間）と50 $^{\circ}$ C（30秒間）と72 $^{\circ}$ C（1分間）とからなるサイクルを30回繰り返すことにより実施した。なお、内部標準として、前記のヒトの各臓器のcDNAを鋳型とし、ヒトG3PDHコントロール増幅セット（Human G3PDH Control Amplimer Set；Clontech社）を用いる同条件のPCRにより、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）の遺伝子を増幅させた。PCR反応産物は、1%アガロースゲルにて電気泳動して解析した。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのmRNAに由来する約500bpの増幅産物は、脾臓にのみ検出された。

実施例3：配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対応するラット由来ポリヌクレオチドの単離及び発現分布の確認

前記実施例1で単離した配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヒト由来ポリヌクレオチドに対応するラット由来ポリヌクレオチドの取得は、以下の手順で実施した。

まず、ラットゲノムDNA（rat genomic DNA；Clontech社）を鋳型とし、前記実施例2で使用した配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとして用いるPCRを行なった。前記PCRは、DNAポリメラーゼ（Pyrobest DNA polymerase；宝酒造社）を用いて、5%DMSO存在下で、98 $^{\circ}$ C（10秒間）と57 $^{\circ}$ C（30秒間）と72 $^{\circ}$ C（1分間）とからなるサイクルを34回繰り返し、更に、このPCR産物を鋳型とし、DNAポリメラーゼ（Pyrobest DNA po

l y m e r a s e ; 宝酒造社) を用いて、5 % D M S O 存在下で、9 8 ° C (1 0 秒間) と 5 5 ° C (3 0 秒間) と 7 2 ° C (1 分間) とからなるサイクルを 3 4 回繰り返すことにより実施した。得られた P C R 断片の部分配列解析を行ない、R A C E 法に用いるプライマーとして、配列番号 2 1 ~ 2 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド 4 種を設計した。

以下の R A C E 法では、鋳型として、ラット脳 c D N A (M a r a t h o n - R e a d y c D N A ; C l o n t e c h 社) を使用した。5' - R A C E では、1 回目の P C R には、配列番号 2 1 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、A P 1 プライマー (前記 c D N A に添付) とを使用し、2 回目の P C R には、配列番号 2 2 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、A P 2 プライマー (前記 c D N A に添付) とを使用した。また、3' - R A C E では、1 回目の P C R には、配列番号 2 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、前記 A P 1 プライマーとを使用し、2 回目の P C R には、配列番号 2 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、前記 A P 2 プライマーとを使用した。

5' - R A C E の 1 回目及び 2 回目の P C R は、それぞれ、T a q ポリメラーゼ (L A T a q ; C l o n t e c h 社) を用い、9 8 ° C (2 0 秒間) と 6 5 ° C (3 0 秒間) と 7 2 ° C (3 分間) とからなるサイクルを 3 4 回繰り返すことにより実施した。また、3' - R A C E の 1 回目及び 2 回目の P C R は、それぞれ、T a q ポリメラーゼ (L A T a q ; C l o n t e c h 社) を用い、9 8 ° C (2 0 秒間) と 6 5 ° C (3 0 秒間) と 7 2 ° C (5 分間) とからなるサイクルを 3 4 回繰り返すことにより実施した。5' - R A C E 及び 3' - R A C E でそれぞれ得られた P C R 産物の塩基配列解析を行なった。

決定された塩基配列に基づいて、配列番号 2 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを設計した。このプライマーセットを用いて前記ラット脳 c D N A を鋳型とする P C R を実施した。前記 P C R は、DNA ポリメラーゼ (p f u t u r b o D N A p o l y m e r a s e ; S T R A T A G E N E 社) を用い、9 8 ° C (2 0 秒間) と 6 4 ° C (3 0 秒間) と 7 4 ° C (2 分間) とからなるサイクルを 1

2回、98℃（20秒間）と61℃（30秒間）と74℃（2分間）とからなるサイクルを12回、そして、98℃（20秒間）と58℃（30秒間）と74℃（2分間）とからなるサイクルを16回繰り返した。更に、このPCR産物を鋳型とし、DNAポリメラーゼ（*pfu turbo DNA polymerase*; STRATAGENE社）を用い、98℃（20秒間）と64℃（30秒間）と74℃（2分30秒間）とからなるサイクルを12回、98℃（20秒間）と61℃（30秒間）と74℃（2分30秒間）とからなるサイクルを12回、そして、98℃（20秒間）と58℃（30秒間）と74℃（2分30秒間）とからなるサイクルを16回繰り返した。このPCR産物（以下、PCR産物Aと称する）をサブクローニングし、塩基配列確認を行なった。

続いて、決定された塩基配列に基づいて、配列番号13で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（フォワードプライマー）と配列番号14で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（リバースプライマー）とを設計した。なお、前記の各プライマーの5'末端には、それぞれ、XbaI認識配列が付加してある。このプライマーセットを用いて、先にサブクローニングした前記PCR産物Aを鋳型とするPCRを実施した。前記PCRは、DNAポリメラーゼ（*pfu turbo DNA polymerase*; STRATAGENE社）を用い、98℃（20秒間）と59℃（30秒間）と74℃（1分30秒間）とからなるサイクルを25回繰り返すことにより実施した。その結果、約1.0 kbのDNA断片が増幅された。この断片を制限酵素XbaIで消化した後、pEF-BOSプラスミドを用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター法によりDNAシーケンサー（ABI 377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社）を用いて決定し、配列番号15で表される塩基配列が得られた。この配列から予測されるアミノ酸配列は、配列番号16で表されるアミノ酸配列であった。

次に、得られた前記塩基配列を基に設計した配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとし、ラット臍β細胞株RIN-5F（ATCC: CRL-2058）由来のcDNAを鋳型としてPCRを行なった。なお、

前記cDNAは、総RNA精製試薬（ISOGEN；ニッポンジーン）を用いて総RNAを調製した後、逆転写酵素反応を行なうことにより、合成した。また、前記PCRは、Taqポリメラーゼ（rTaq；宝酒造社）を用い、5%DMSO存在下で、94℃（30秒間）と57℃（30秒間）と72℃（1分間）とからなるサイクルを34回繰り返すことにより実施した。PCR反応産物は、1%アガロースゲルにて電気泳動して解析した。その結果、ラット膵β細胞株において、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのmRNAが発現していることが確認された。

更に、マウス膵β細胞株NIT-1細胞（ATCC：CRL-2055）から調製したcDNA〔ラット膵β細胞株RIN-5Fの場合と同様にして、総RNA精製試薬（ISOGEN；ニッポンジーン）を用いて総RNAを調製した後、逆転写酵素反応を行なうことにより、合成した〕について、先に得られたラット由来ポリヌクレオチドの塩基配列（すなわち、配列番号15で表される塩基配列）に基づいて設計した配列番号19で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号20で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーセットとして用いたこと以外は、ラット膵β細胞株RIN-5Fの場合と同じ条件によりPCRを行った結果、約400bpのDNA断片が検出された。前記DNA断片は、配列番号1で表される塩基配列からなるヒト由来ポリヌクレオチド又は配列番号15で表される塩基配列からなるラット由来ポリヌクレオチドに対応するマウス由来ポリヌクレオチドに由来するものと考えられ、マウス膵β細胞株においても、配列番号2又は16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対応するマウス由来ポリヌクレオチドのmRNAが発現していることが確認された。

前記実施例2及び本実施例の結果より、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいは、それに対応するラット又はマウスのポリヌクレオチドのmRNAは、糖尿病に大きく関係する臓器である膵臓に特異的に発現していることが判明した。また、膵β細胞株にも発現していることが明かとなった。従って、各種細胞株に、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいは、

それに対応するラット又はマウスのポリヌクレオチドを導入して、目的ポリペプチドを発現させなくても、膵 β 細胞株又は膵細胞を用いて、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド等を活性化する物質を選択することが可能である。

実施例4：配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの293-EBNA細胞による発現と過剰発現による細胞内cAMP濃度の変化

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させるために、前記実施例1で作成したクローン、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする全長cDNAを導入したpEF-BOSシグナルシーケンスフラッグプラスミド（以下、プラスミドpEF-BOS SSF-NAと称する）を用いた。これは、目的とするポリペプチドのN末端にシグナルシーケンスを付加することができる発現ベクターを用いることにより、目的ポリペプチドを細胞膜に高頻度が発現させるためである。

まず、コラーゲンコートした24穴プレートに293-EBNA細胞（ 7×10^4 細胞/ウェル）を播種して24時間培養した後、トランスフェクション試薬（FuGENE6；Boehringer Mannheim社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS SSF-NA又はプラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）を遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に20時間培養し、続いて、培地を吸引した後、 1 mmol/L -IBMX（3-isobutyl-1-methylxanthine）/DMEM500 μL を加え、5%CO₂存在下、37℃で40分間インキュベートを行なった。なお、前記IBMXはホスホジエステラーゼ阻害剤である。培地を吸引し、得られた細胞をcAMP量測定に供した。cAMP量の測定は、市販のcAMP酵素免疫アッセイ系（cAMP enzyme immunoassay system；Amersham pharmacia biotech社）により行なった。

プラスミドpEF-BOS SSF-NAを導入した細胞では、細胞内cAMP量がプラスミド量依存的に上昇することが判明した。一方、プラスミドpEF-BOSを導入した細胞では、細胞内cAMP量に変化がなかった。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを過剰発現することにより、cA

MP量が上昇したことから、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおけるセカンドメッセンジャーの1つは、cAMPであることが判明した。

実施例5：配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのマウス膵β細胞株NIT-1細胞による発現と過剰発現によるインスリン分泌量の変化

配列番号2又は16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、膵臓特異的に発現しており、膵β細胞株でもその発現を確認している（前記実施例2及び3参照）。そこで、膵β細胞株に、前記ポリペプチドを過剰発現させることにより、前記ポリペプチドの機能を推定することができる。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させるために、前記実施例4で使用したのと同じプラスミドpEF-BOS-SF-NAを用いた。

まず、24穴プレートにNIT-1細胞（ 4×10^5 細胞）を播種して24時間培養した後、トランスフェクション試薬（FuGENE6；Boehringer Mannheim社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-SF-NA又はプラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）を遺伝子導入した。遺伝子導入した後、2日又は3日間培養し、続いて、培地を吸引した後、リン酸緩衝溶液（PBS）で洗い、3.3mmol/Lグルコース含有KRBB（Krebs-Ringer bicarbonate buffer）1mLを加え、5%CO₂存在下、37℃で1～2時間インキュベートした。前記バッファーを吸引除去し、3.3mmol/Lグルコース含有KRBB1mL、又は16.8mmol/Lグルコース含有KRBB1mLのいずれか一方を加え、5%CO₂存在下、37℃で2時間インキュベートした。この上清をインスリン分泌量測定に供した。インスリン分泌量の測定は、市販のインスリンラジオイムノアッセイキット（ファデセフィンシュリン；ファルマシアアップジョン社）により行なった。

その結果、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを過剰発現することにより、3.3mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量の変化はないが、16.8mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量が増加していた。

以上の結果より、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、前記実施例2で示したように、膵臓特異的に発現しているGタンパク質共役型受容体であり、本実施例で示したように、グルコース濃度依存的インスリン分泌促進作用を有することが示された。従って、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を活性化することにより、膵臓疾患、特に糖尿病の予防及び／又は治療が可能であることが考えられる。

実施例6：細胞内cAMP濃度の変化を指標とした、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング(1)

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させるために、前記実施例1で作成したクローン、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする全長cDNAを導入したpEF-BOSプラスミド（以下、プラスミドpEF-BOS-NAと称する）を用いた。

まず、コラーゲンコートした24穴プレートに293-EBNA細胞（ 7×10^4 細胞/ウェル）を播種して24時間培養後、トランスフェクション試薬（FuGENE6；Boehringer Mannheim社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-NA又はプラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）50ngを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に20時間培養し、続いて、培地を吸引した後、1mmol/L-IBMX（3-isobutyl-1-methylxanthine）/DMEM400 μ Lを加え、5%CO₂存在下、37℃で10分間インキュベートした。更に、1mmol/L-IBMX/DMEM100 μ Lで希釈した試験化合物（例えば、化合物、ペプチド、又は抗体等）を添加し、更に30分間インキュベートした。培地を吸引し、得られた細胞をcAMP量測定に供した。cAMP量の測定は、市販のcAMP酵素免疫アッセイ系（cAMP enzyme immunoassay system；Amersham pharmacia biotech社）により行ない、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞に特異的なcAMP量の上昇が観察された試験化合物を、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する物質として選択することができる。

実施例7：細胞内cAMP濃度の変化を指標とした、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング(2)

本実施例では、前記実施例6で使用したのと同じプラスミドpEF-BOS-NAを使用した。

コラーゲンコートした96穴プレートに293-EBNA細胞(1×10^4 細胞/ウェル)を播種し、10%牛胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で一晩培養後、トランスフェクション試薬(LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL社)を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-NA又はプラスミドpEF-BOS(コントロール用の空ベクター)0.01ngとpCRE-Lucベクター(CLONTECH社)5ngとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に18~20時間培養し、培地で希釈した試験化合物(糖尿病治療効果を有することが知られていない公知化合物)を加え、5%CO₂存在下、37℃で5~6時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液(細胞溶解液LCβ; 東洋インキ)で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット(ピッカジーン発光キット; 東洋インキ)及び測定装置(ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories社)を用いて測定した。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞に特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、前記ポリペプチドの活性を増強する物質として選択したところ、2-(ピリジン-4-イル)エチルチオベンゾエート(LT-1 Z 0059519; LaboTest社)等、4つの異なる化合物を取得することができた。2-(ピリジン-4-イル)エチルチオベンゾエートのEC₅₀値は、3.2μMであった。

実施例8：マウス膵β細胞株MIN6細胞を用いたインスリン分泌実験(1)

24穴プレートにMIN6細胞(2×10^5 細胞)を播種し、10%FCS含有DMEM中で2日間培養した。続いて、培地を吸引した後、KRB-HEPES(140mmol/L-NaCl, 3.6mmol/L-KCl, 0.5mmol/L-NaH₂PO₄, 0.5mmol/L-MgSO₄, 1.5mmol/L

L-CaCl₂, 10mmol/L-Hepes, 2mmol/L-NaHCO₃, 0.1%BSA, pH7.4)で洗い、2.8mmol/Lグルコース含有KRB-HEPES(1ml)を加え、5%CO₂存在下、37°Cで30~60分間インキュベートした。

前記バッファーを吸引除去した後、実施例7で得られた4つのスクリーニング結果物の内、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエートを2.8mmol/L又は16.8mmol/Lグルコース含有KRB-HEPESで希釈した2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート溶液0.5mlを加え、5%CO₂存在下、37°Cで20分間インキュベートした。この上清をインスリン分泌量測定に供した。

インスリン分泌量の測定は、市販のインスリン・ラジオイムノアッセイキット(ファデセフィンシュリン; ファルマシアアップジョン社)により行なった。

その結果、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート刺激により、2.8mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量は増加しなかったが、16.8mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量が増加していた。従って、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエートは、高濃度グルコース刺激時のみ、インスリン分泌促進作用を示すことがわかった。

また、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート以外の実施例7で得られた残る3つのスクリーニング結果物の内、1つの化合物についても、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエートと同様の実験を実施した。その結果、前記化合物刺激により、2.8mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量は増加しなかったが、16.8mmol/Lグルコース存在下ではインスリン分泌量が増加していた。従って、前記化合物も、高濃度グルコース刺激時のみ、インスリン分泌促進作用を示すことがわかった。

実施例9: SDラット及びGKラットを用いた単回経口糖負荷試験

SDラット(4週齢; 日本クレア社)は、一晩絶食させ、グルコース2g/kgを経口投与した。なお、グルコース負荷5分前に、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート(LT-1 Z 0059519)10.0mg/kgを腹腔内投与(i.p.)した。グルコース負荷後、0分間、30分間、6

0分間、及び120分間経過後に適量採血し、血糖値及び血漿中インスリン濃度の測定に供した。

血糖値の測定には、血液と0.33mol/L過塩素酸とを混合（血液：0.33mol/L過塩素酸＝1：10）した後、遠心分離（3000×g，10分間，4℃）した上澄液を用いた。血漿中インスリン濃度の測定には、血液を遠心分離（3000×g，10分間，4℃）した上澄液を用いた。また、血糖値の測定には、グルコースCテストワコー（Wako社）を用いた。また、血漿中インスリン濃度の測定には、ラットーインスリンアッセイシステム（Amersham社）を用いた。

結果を図1及び図2に示す。図1は、グルコース経口負荷後の血漿中インスリン濃度（単位＝ng/mL）の経時変化を示し、図2は、グルコース経口負荷後の血糖値（単位＝mg/dL）の経時変化を示す。図1及び図2に示す記号

「*」は、コントロール群〔すなわち、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート無添加群〕に対する有意差が、 $p < 0.05$ （スチューデントのt検定）であることを意味する。

図1に示すように、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート100mg/kg投与により、グルコース負荷後30分間経過後において、血漿中インスリン濃度の有意な上昇が認められた。また、グルコース負荷後30分間経過後において、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート100mg/kg投与群で、糖負荷による血糖値の上昇が有意に抑制された。

従って、糖負荷SDラットにおいて、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエートの血漿中インスリン量増加作用、及び血糖低下作用が確認された。

次に、GK（Goto-Kakizaki）ラット（インスリン分泌不全2型糖尿病モデル、7週齢；日本チャールスリバー社）を用いた単回経口糖負荷試験を行なった。なお、GKラットは、1975年東北大学医学部後藤由夫名誉教授らによって、Wistar系ラットにおける経口糖負荷試験時の耐糖能の悪さを指標に、選択交配により確立された系統である。

経口糖負荷試験は、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエートを経口投与（p.o.）したこと以外は、SDラットの場合と同様に行なった。

グルコース経口負荷後の血糖値（単位＝mg/dL）の経時変化を、図3に示す。図3に示す記号「*」は、コントロール群〔すなわち、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート無添加群〕に対する有意差が、 $p < 0.05$ （スチューデントのt検定）であることを意味し、記号「**」は、前記有意差が $p < 0.01$ であることを意味する。

図3に示すように、グルコース負荷後30分間及び60分間経過後において、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート100mg/kg投与により、血糖値の上昇が有意に抑制され、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエートの有効性が糖尿病モデルラットでも確認できた。

実施例10：細胞内cAMP濃度の変化を指標とした、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング（3）

本実施例では、前記実施例6で使用したのと同じプラスミドpEF-BOS-NAを使用した。

コラーゲンコートした24穴プレートに293-EBNA細胞（ 7×10^4 細胞/ウェル）を播種し、1%牛胎児血清（FCS）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中で一晚培養後、トランスフェクション試薬（LIPOFECTAMINE 2000；GIBCO BRL社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-NA又はプラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）0.1ngとpCRE-Lucベクター（CLONTECH社）20ngとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に18～20時間培養し、0.1%BSA含有培地で希釈した試験化合物を加え、5%CO₂存在下、37℃で6時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液（細胞溶解液LCβ；東洋インキ）で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット（ピッカジーン発光キット；東洋インキ）及び測定装置（ML3000 microtiter plate luminometer；Dynatech Laboratories社）を用いて測定した。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞に特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、前記ポリペプチドの活性を増強する物質として選択したところ、生体成分であるL-α-リゾホスファチ

ジルコリン オレオイル (L1881; SIGMA社) を取得することができた。

実施例 11: 細胞内 cAMP 濃度の変化を指標とした、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング (4)

本実施例では、前記実施例 6 で使用したのと同じプラスミド pEF-BOS-NA を使用した。

コラーゲンコートした 96 穴プレートに 293-EBNA 細胞 (1×10^4 細胞/ウェル) を播種して 24 時間培養後、トランスフェクション試薬 (LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL 社) を用いて、前記細胞にプラスミド pEF-BOS-NA 又はプラスミド pEF-BOS (コントロール用の空ベクター) 3 ng を遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に 20 時間培養し、続いて、培地を吸引した後、 1 mmol/L IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) / 0.1% BSA / DMEM $80 \mu\text{L}$ を加え、 $5\% \text{ CO}_2$ 存在下、 37°C で 10 分間インキュベートした。更に、 1 mmol/L IBMX / 0.1% BSA / DMEM $20 \mu\text{L}$ で希釈した試験化合物を添加し、更に 30 分間インキュベートした。培地を吸引し、得られた細胞を cAMP 量測定に供した。cAMP 量の測定は、市販の cAMP 酵素免疫アッセイ系 (cyclic AMP kit; 日本シェーリング社) により行なった。実施例 10 で選択した化合物 (L- α -リゾホスファチジルコリン オレオイル) では、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞に特異的な cAMP 量の上昇が観察され、従って、この化合物を、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する物質として選択した。

実施例 12: マウス膵 β 細胞株 MIN6 細胞を用いたインスリン分泌実験 (2)

コラーゲンコートした 24 穴プレートに MIN6 細胞 (2.5×10^5 細胞) を播種し、 10% FCS 含有 DMEM (Cat. No. 11995-065; GIBCO BRL 社) 中で 2 日間培養した。続いて、培地を吸引した後、 10% FCS 含有且つグルコース不含 DMEM (Cat. No. 11966-025; GIBCO BRL 社) 0.4 mL を加え、 $5\% \text{ CO}_2$ 存在下、 37°C で 2 時間インキュベートした。

前記培地を吸引除去し、2.8 mmol/L又は16.8 mmol/Lグルコース含有DMEM (Cat. No. 11966-025; GIBCO BRL 社) で希釈したL- α -リゾホスファチジルコリン オレオイル (すなわち、実施例10で得られたスクリーニング結果物) 溶液0.5 mlを加え、5% CO₂ 存在下、37°Cで30分間インキュベートした。この上清をインスリン分泌量測定に供した。

インスリン分泌量の測定は、市販のインスリン・ラジオイムノアッセイキット (ファデセフィンシュリン; ファルマシアアップジョン社) により行なった。

その結果、16.8 mmol/Lグルコース存在下、L- α -リゾホスファチジルコリン オレオイル刺激により、インスリン分泌量が増加していた。

産業上の利用可能性

配列番号2で表されるアミノ酸配列若しくは配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、その機能的等価改変体、又は相同ポリペプチドは、特異的であって、高グルコース濃度下において、インスリン分泌を促進する活性を有する。従って、前記ポリペプチドによれば、正常範囲内に血糖をコントロール可能な糖尿病治療剤 (特にはインスリン分泌促進剤、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進剤) として有用な物質を得るための簡便なスクリーニング系を構築することができる。

また、本発明のスクリーニングツール又は本発明のスクリーニング方法により得ることのできる、前記ポリペプチドの活性化物質を有効成分とし、正常範囲内に血糖をコントロール可能な糖尿病治療用医薬組成物 (特にはインスリン分泌促進用医薬組成物、より好ましくは、高グルコース濃度下特異的インスリン分泌促進用医薬組成物) を製造することができる。

また、本発明のスクリーニングツールの1つであるスクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜は、糖尿病治療剤として有用な物質をスクリーニングする為のみでなく、糖尿病治療用医薬組成物の品質規格の確認試験において、用いることも可能である。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3、4、13、及び14の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

3. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び／又は(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示すポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

4. 請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチドが、(a) 高グルコース濃度下、活性化されることにより、膵β細胞からのインスリン分泌を促進する活性、及び(b) 活性化されることにより、前記細胞内cAMP量を増加させる活性を示す、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

5. 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号16で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

6. 請求項1~5のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している細

胞である、糖尿病治療剤スクリーニングツール。

7. 請求項6に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び

請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程

を含む、糖尿病治療剤をスクリーニングする方法。

8. 請求項6に記載の細胞、若しくはその細胞膜、又は請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドと、試験化合物とを、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、及び前記細胞若しくはその細胞膜又は前記ポリペプチドへの標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程

を含む、糖尿病治療剤をスクリーニングする方法。

9. 糖尿病治療剤がインシュリン分泌促進剤である、請求項7又は8に記載のスクリーニングする方法。

10. 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの活性化物質を含有する、糖尿病治療用医薬組成物。

11. 請求項7又は8に記載の方法によって得られる物質を含有する、糖尿病治療用医薬組成物。

12. インシュリン分泌促進用医薬組成物である、請求項10又は11に記載の糖尿病治療用医薬組成物。

13. 請求項6に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、

請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、及び

分析した物質を製剤化する工程

を含む、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法。

14. 請求項6に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、

前記細胞又はその細胞膜への標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程、及び

分析した物質を製剤化する工程

を含む、糖尿病治療用医薬組成物の製造方法。

15. 糖尿病治療用医薬組成物がインシュリン分泌促進用医薬組成物である、請求項13又は14に記載の製造方法。

16. 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの活性化物質を、糖尿病治療が必要な対象に、有効量で投与することを含む、糖尿病治療方法。

17. 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの活性化物質を、インシュリン分泌促進が必要な対象に、有効量で投与することを含む、インシュリン分泌促進方法。

18. 請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの活性化物質の、糖尿病治療用医薬組成物及び／又はインシュリン分泌促進用医薬組成物を製造するための使用。

1 / 2

FIG. 1

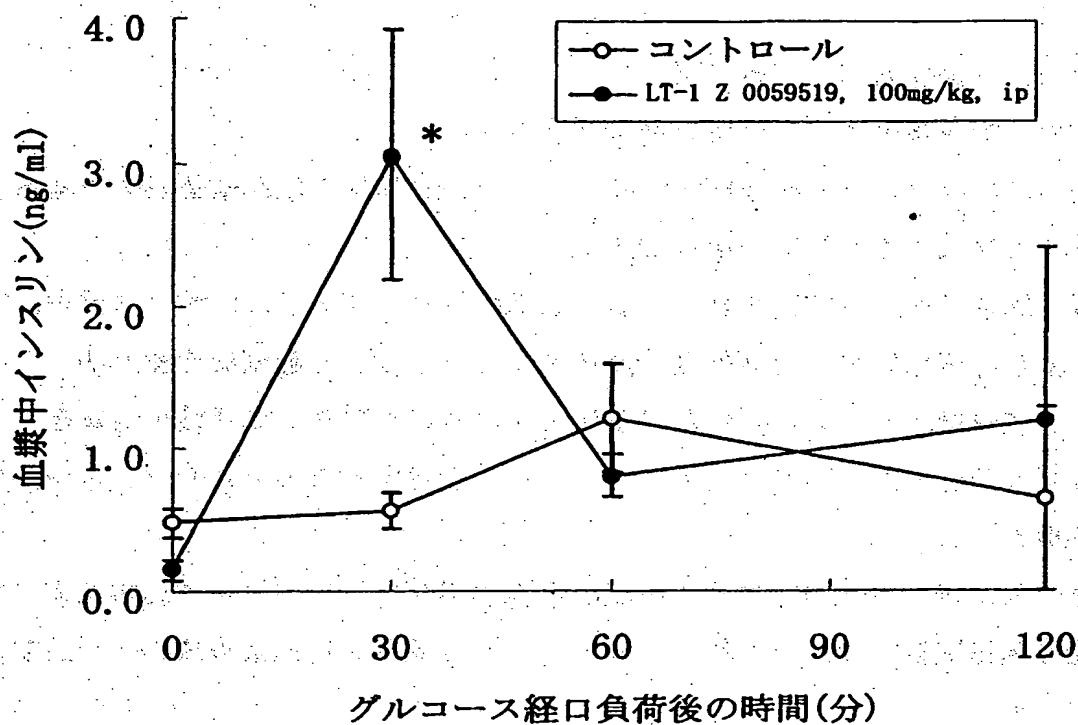
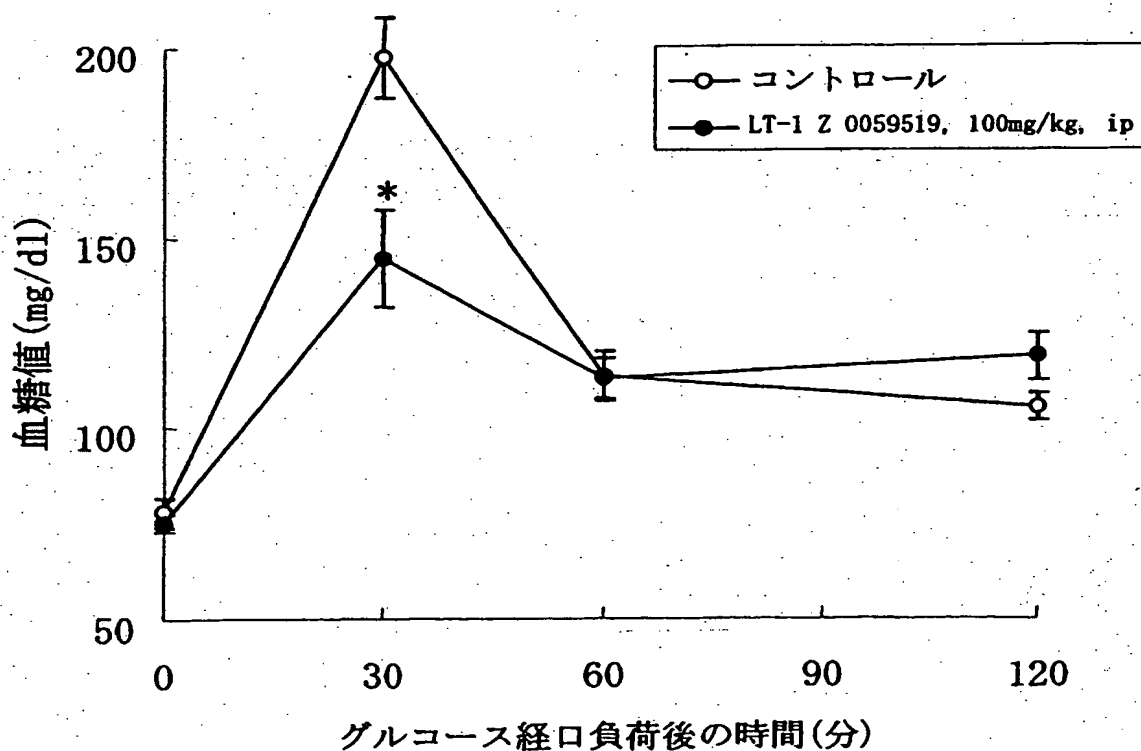
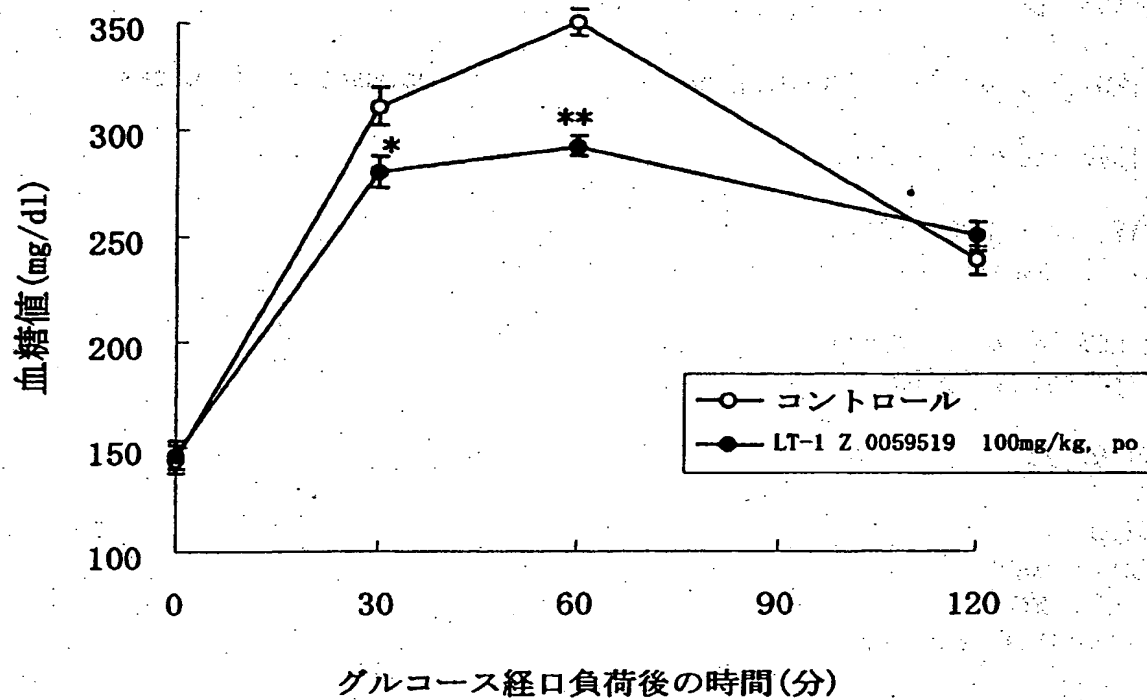


FIG. 2



2 / 2

FIG. 3



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for screening agents for the treatment of diabetes

<130> Y0128PCT-659

<150> JP 2000-367349

<151> 2000-12-01

<150> JP 2001-243841

<151> 2001-08-10

<160> 26

<210> 1

<211> 1008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1008)

<400> 1

atg	gaa	tca	tct	ttc	tca	ttt	gga	gtg	atc	ctt	gct	gtc	ctg	gcc	tcc	48
Met	Glu	Ser	Ser	Phe	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	
1				5				10					15			

ctc	atc	att	gct	act	aac	aca	cta	gtg	gct	gtg	gct	gtg	ctg	ctg	ttg	96
Leu	Ile	Ile	Ala	Thr	Asn	Thr	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	
			20					25					30			

atc	cac	aag	aat	gat	ggt	gtc	agt	ctc	tgc	ttc	acc	ttg	aat	ctg	gct	144
Ile	His	Lys	Asn	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Cys	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Ala	
		35					40					45				

gtg	gct	gac	acc	ttg	att	ggt	gtg	gcc	atc	tct	ggc	cta	ctc	aca	gac	192
Val	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Leu	Thr	Asp	
	50					55					60					

cag	ctc	tcc	agc	cct	tct	cgg	ccc	aca	cag	aag	acc	ctg	tgc	agc	ctg	240
Gln	Leu	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Pro	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Cys	Ser	Leu	
65					70					75					80	

2/12

cgg atg gca ttt gtc act tcc tcc gca gct gcc tct gtc ctc acg gtc	288
Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ser Val Leu Thr Val	
85 90 95	
atg ctg atc acc ttt gac agg tac ctt gcc atc aag cag ccc ttc cgc	336
Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg	
100 105 110	
tac ttg aag atc atg agt ggg ttc gtg gcc ggg gcc tgc att gcc ggg	384
Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly	
115 120 125	
ctg tgg tta gtg tct tac ctc att ggc ttc ctc cca ctc gga atc ccc	432
Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro	
130 135 140	
atg ttc cag cag act gcc tac aaa ggg cag tgc agc ttc ttt gct gta	480
Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val	
145 150 155 160	
ttt cac cct cac ttc gtg ctg acc ctc tcc tgc gtt ggc ttc ttc cca	528
Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro	
165 170 175	
gcc atg ctc ctc ttt gtc ttc ttc tac tgc gac atg ctc aag att gcc	576
Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala	
180 185 190	
tcc atg cac agc cag cag att cga aag atg gaa cat gca gga gcc atg	624
Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met	
195 200 205	
gct gga ggt tat cga tcc cca cgg act ccc agc gac ttc aaa gct ctc	672
Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu	
210 215 220	
cgt act gtg tct gtt ctc att ggg agc ttt gct cta tcc tgg acc ccc	720
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro	
225 230 235 240	
ttc ctt atc act ggc att gtg cag gtg gcc tgc cag gag tgt cac ctc	768
Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu	
245 250 255	
tac cta gtg ctg gaa cgg tac ctg tgg ctg ctc ggc gtg ggc aac tcc	816
Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser	

3/12

260	265	270	
ctg ctc aac cca ctc atc tat gcc tat tgg cag aag gag gtg cga ctg			864
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu			
275	280	285	
cag ctc tac cac atg gcc cta gga gtg aag aag gtg ctc acc tca ttc			912
Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe			
290	295	300	
ctc ctc ttt ctc tcg gcc agg aat tgt ggc cca gag agg ccc agg gaa			960
Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu			
305	310	315	320
agt tcc tgt cac atc gtc act atc tcc agc tca gag ttt gat ggc taa			1008
Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly			
325	330	335	

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu			
20	25	30	
Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala			
35	40	45	
Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp			
50	55	60	
Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu			
65	70	75	80
Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ser Val Leu Thr Val			
85	90	95	
Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg			
100	105	110	
Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly			
115	120	125	
Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro			
130	135	140	
Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val			
145	150	155	160
Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro			

4/12

165										170				175			
Ala	Met	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asp	Met	Leu	Lys	Ile	Ala		
180										185				190			
Ser	Met	His	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Lys	Met	Glu	His	Ala	Gly	Ala	Met		
195										200				205			
Ala	Gly	Gly	Tyr	Arg	Ser	Pro	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Ala	Leu		
210										215				220			
Arg	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Ile	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Ser	Trp	Thr	Pro		
225										230				235			
Phe	Leu	Ile	Thr	Gly	Ile	Val	Gln	Val	Ala	Cys	Gln	Glu	Cys	His	Leu		
245										250				255			
Tyr	Leu	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Asn	Ser		
260										265				270			
Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Gln	Lys	Glu	Val	Arg	Leu		
275										280				285			
Gln	Leu	Tyr	His	Met	Ala	Leu	Gly	Val	Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Phe		
290										295				300			
Leu	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Arg	Asn	Cys	Gly	Pro	Glu	Arg	Pro	Arg	Glu		
305										310				315			
Ser	Ser	Cys	His	Ile	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Phe	Asp	Gly			
325										330				335			

<210> 3
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 3
aaaatctaga atggaatcat ctttctcatt tg

32

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

5/12

<400> 4

cggctctaga ttagccatca aactctgagc tgg

33

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gggctgcttg atggcaaggt acc

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ctgcggagga agtgacaaat gcc

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggagctttgc tctatcctgg acc

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acctctacct agtgctggaa cgg

23

<210> 9

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

6/12

ctgaggactg aaaagagagg gtgagtaatt cticcatgacc ttaggatcc caaagatggc 60
 gacctgccag cctggactgc cagcgaaggc cagaatcgtg ctgtagctct gaaccacag 120
 ctccctctgcc cctggcccat gagaatttca gctggagaga tagcatgccc tggtaagtga 180
 agtcctgccca cticgagaca tggaatcadc tttctcattt ggagtgatcc ttgtgtcct 240
 ggcctccctc atcattgcta ctaacacact agtggctgtg gctgtgctgc tgttgatcca 300
 caagaatgat ggtgtcagtc tctgcttcac ctigaatctg gctgtggctg acaccttgat 360
 tgggtgggcc atctctggcc tactcacaga 390

<210> 10

<211> 223

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ctgtggctgc tcggcgtggg caactccctg ctcaaccac tcatctatgc ctattggcag 60
 aaggaggctg gactgcagct ctaccacatg gccctaggag tgaagaaggt gctcacctca 120
 ttctctctct ttctctcggc caggaattgt ggcccagaga ggcccaggga aagttcctgt 180
 cacatcgtca ctatctccag ctacagagttt gatggctaag acg 223

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gttgatccac aagaatgatg g

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gaggcaatct tgagcatgtc g

21

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized

7/12

primer sequence

<400> 13

aaaatctaga atggagtcatt cttcttcatt tgg

33

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

aaaatctaga ctagccatcg agctccggc

29

<210> 15

<211> 1008

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1008)

<400> 15

atg	gag	tca	tct	ttc	tca	ttt	gga	gtg	atc	ctt	gct	gtc	ctg	acc	atc	48
Met	Glu	Ser	Ser	Phe	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Thr	Ile	
1				5				10				15				

ctt	atc	att	gct	gtt	aat	gcg	ctg	gtg	gtt	gtg	gct	atg	ctg	cta	tca	96
Leu	Ile	Ile	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Val	Val	Val	Ala	Met	Leu	Leu	Ser	
			20					25				30				

atc	tac	aag	aat	gat	ggt	gtt	ggc	ctt	tgc	ttc	acc	tta	aat	ctg	gcc	144
Ile	Tyr	Lys	Asn	Asp	Gly	Val	Gly	Leu	Cys	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Ala	
		35					40					45				

gtg	gct	gat	acc	ttg	att	ggc	gtg	gct	att	tct	ggg	cta	ggt	aca	gac	192
Val	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Val	Thr	Asp	
		50				55				60						

cag	ctc	tcc	agc	tct	gct	cag	cac	aca	cag	aag	acc	ttg	tgt	agc	ctt	240
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

8/12

Gln	Leu	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	His	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Cys	Ser	Leu	
65					70					75					80	
egg	atg	gca	ttc	gtc	act	tct	tct	gca	gcc	gcc	tct	gtc	ctc	acg	gtc	288
Arg	Met	Ala	Phe	Val	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
				85					90					95		
atg	ctg	att	gcc	ttt	gac	agg	tac	ctg	gcc	att	aag	cag	ccc	ctc	cgt	336
Met	Leu	Ile	Ala	Phe	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Lys	Gln	Pro	Leu	Arg	
			100					105					110			
tac	ttc	cag	atc	atg	aat	ggg	ctt	gta	gcc	gga	gga	tgc	att	gca	ggg	384
Tyr	Phe	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	Cys	Ile	Ala	Gly	
		115					120					125				
ctg	tgg	ttg	ata	tct	tac	ctt	atc	ggc	ttc	ctc	cca	ctt	gga	gtc	tcc	432
Leu	Trp	Leu	Ile	Ser	Tyr	Leu	Ile	Gly	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly	Val	Ser	
	130					135					140					
ata	ttc	cag	cag	acc	acc	tac	cat	ggg	ccc	tgc	acc	ttc	ttt	gct	gtg	480
Ile	Phe	Gln	Gln	Thr	Thr	Tyr	His	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Phe	Ala	Val	
145					150					155					160	
ttt	cac	cca	agg	ttt	gtg	ctg	acc	ctc	tcc	tgt	gct	ggc	ttc	ttc	cca	528
Phe	His	Pro	Arg	Phe	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Gly	Phe	Phe	Pro	
				165					170					175		
gct	gtg	ctc	ctc	ttt	gtc	ttc	ttc	tac	tgt	gac	atg	ctc	aag	att	gcc	576
Ala	Val	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asp	Met	Leu	Lys	Ile	Ala	
			180					185					190			
tct	gtg	cac	agc	cag	cac	atc	cgg	aag	atg	gaa	cat	gca	gga	gcc	atg	624
Ser	Val	His	Ser	Gln	His	Ile	Arg	Lys	Met	Glu	His	Ala	Gly	Ala	Met	
		195					200					205				
gtt	gga	gct	tgc	cgg	ccc	cca	cgg	cct	gtc	aat	gac	ttc	aag	gct	gtc	672
Val	Gly	Ala	Cys	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Val	Asn	Asp	Phe	Lys	Ala	Val	
	210					215					220					
cgg	act	gta	tct	gtc	ctt	att	ggg	agc	ttc	acc	ctg	tcc	tgg	tct	ccg	720
Arg	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Ile	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Ser	Pro	
225					230					235					240	
ttt	ctc	atc	act	agc	att	gtg	cag	gtg	gcc	tgc	cac	aaa	tgc	tgc	ctc	768
Phe	Leu	Ile	Thr	Ser	Ile	Val	Gln	Val	Ala	Cys	His	Lys	Cys	Cys	Leu	
				245					250					255		

9/12

tac caa gtg ctg gaa aaa tac ctc tgg ctc ctt gga gtt ggc aac tcc 816
 Tyr Gln Val Leu Glu Lys Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
 260 265 270

ctg ctc aac cca ctc atc tat gcc tat tgg cag agg gag gtt cgg cag 864
 Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Arg Glu Val Arg Gln
 275 280 285

cag ctc tgc cac atg gcc ctg ggg gtg aag aag ttc ttt act tca atc 912
 Gln Leu Cys His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Phe Phe Thr Ser Ile
 290 295 300

ttc ctc ctt ctc tcg gcc agg aat cgt ggt cca cag agg acc cga gaa 960
 Phe Leu Leu Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gly Pro Gln Arg Thr Arg Glu
 305 310 315 320

agc tcc tat cac atc gtc act atc agc cag ccg gag ctc gat ggc tag 1008
 Ser Ser Tyr His Ile Val Thr Ile Ser Gln Pro Glu Leu Asp Gly
 325 330 335

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 16

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ile
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser
 20 25 30
 Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
 35 40 45
 Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Val Thr Asp
 50 55 60
 Gln Leu Ser Ser Ser Ala Gln His Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Met Leu Ile Ala Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Leu Arg
 100 105 110
 Tyr Phe Gln Ile Met Asn Gly Leu Val Ala Gly Gly Cys Ile Ala Gly
 115 120 125
 Leu Trp Leu Ile Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Val Ser
 130 135 140

10/12

Ile	Phe	Gln	Gln	Thr	Thr	Tyr	His	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Phe	Ala	Val
145						150				155					160
Phe	His	Pro	Arg	Phe	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Gly	Phe	Phe	Pro
				165				170							175
Ala	Val	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asp	Met	Leu	Lys	Ile	Ala
				180				185						190	
Ser	Val	His	Ser	Gln	His	Ile	Arg	Lys	Met	Glu	His	Ala	Gly	Ala	Met
		195					200					205			
Val	Gly	Ala	Cys	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Val	Asn	Asp	Phe	Lys	Ala	Val
	210					215					220				
Arg	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Ile	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Ser	Pro
225					230					235					240
Phe	Leu	Ile	Thr	Ser	Ile	Val	Gln	Val	Ala	Cys	His	Lys	Cys	Cys	Leu
				245					250					255	
Tyr	Gln	Val	Leu	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Asn	Ser
			260				265						270		
Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Glu	Val	Arg	Gln
		275					280					285			
Gln	Leu	Cys	His	Met	Ala	Leu	Gly	Val	Lys	Lys	Phe	Phe	Thr	Ser	Ile
	290					295					300				
Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Arg	Asn	Arg	Gly	Pro	Gln	Arg	Thr	Arg	Glu
305					310					315					320
Ser	Ser	Tyr	His	Ile	Val	Thr	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	Leu	Asp	Gly	
				325					330					335	

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 17

gtggctgata ccttgattgg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 18

gcacagctgg gaagaagcca

20

<210> 19

11/12

<211> 20
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 19
gattggcgtg gctatttctg

20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 20
ggaagaagcc agcacaggag

20

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 21
taagatatca accacagccc tgca

24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 22
ctacaagccc attcatgac tgga

24

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 23
ccgcctctgt cctcacggtc a

21

<210> 24
<211> 23

12/12

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 24

acaggtacct ggccattaag cag

23

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 25

tagagcacat ctaatcctgt cc

22

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 26

ttagagatga aagtcaggat ccagc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K38/00, A61P3/10, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K38/00, A61P3/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/50562 A2 (Synaptic Pharmaceutical Corporation), 31 August, 2000 (31.08.2000), & AU 200030035 A & EP 1075493 A2 & US 6221660 B	1-15, 18
A	EP 1092727 A2 (Pfizer, Limited), 18 April, 2001 (18.04.2001), (Family: none)	1-15, 18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January, 2002 (11.01.02)

Date of mailing of the international search report

22 January, 2002 (22.01.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10472

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02
A61K38/00, A61P3/10, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02
A61K38/00, A61P3/10, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/50562 A2 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 2000.08.31 & AU 200030035 A & EP 1075493 A2 & US 6221660 B	1-15, 18
P, A	EP 1092727 A2 (Pfizer Limited) 2001.04.18 (ファミリーなし)	1-15, 18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.01.02

国際調査報告の発送日

22.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。